

EINE METHODE ZUR BESTIMMUNG
DES GESAMTCORTISOLS
UND DES DIFFUSIBLEN CORTISOLS
IM SERUM MIT IMMOBILISIERTEM
ANTI - CORTISOL - ANTIKÖRPER

Fritz Zehmisch

1970

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 • 8000 München 5 • Telefon 268177

AUS DER I. FRAUENKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROF. DR. J. ZANDER

EINE METHODE ZUR BESTIMMUNG DES GESAMTCORTISOLS
UND DES DIFFUSIBLEN CORTISOLS IM SERUM MIT IM -
MOBILISIERTEM ANTI - CORTISOL - ANTIKÖRPER

INAUGURAL - DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
AN DER LUDWIG MAXIMILIANS - UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN



VORGELEGT VON

FRITZ ZEHMISCH

AUS

ULM/DO

1978

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. E. Kuß

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. J. Zander

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.1978



1	INHALT	1
2	1. Einleitung	2
3	2. Die Bedeutung der Eltern	3
4	3. Die Entwicklung des Kindes	4
5	4. Die Erziehung des Kindes	5
6	5. Die Beziehung des Kindes zu den Eltern	6
7	6. Die Rolle der Eltern	7
8	7. Die Verantwortung der Eltern	8
9	8. Die Unterstützung der Eltern	9
10	9. Die Förderung der Eltern	10
11	10. Die Hilfe der Eltern	11
12	11. Die Beratung der Eltern	12
13	12. Die Unterstützung der Eltern	13
14	13. Die Förderung der Eltern	14
15	14. Die Hilfe der Eltern	15
16	15. Die Beratung der Eltern	16
17	16. Die Unterstützung der Eltern	17
18	17. Die Förderung der Eltern	18
19	18. Die Hilfe der Eltern	19
20	19. Die Beratung der Eltern	20
21	20. Die Unterstützung der Eltern	21
22	21. Die Förderung der Eltern	22
23	22. Die Hilfe der Eltern	23
24	23. Die Beratung der Eltern	24
25	24. Die Unterstützung der Eltern	25
26	25. Die Förderung der Eltern	26
27	26. Die Hilfe der Eltern	27
28	27. Die Beratung der Eltern	28
29	28. Die Unterstützung der Eltern	29
30	29. Die Förderung der Eltern	30
31	30. Die Hilfe der Eltern	31
32	31. Die Beratung der Eltern	32
33	32. Die Unterstützung der Eltern	33
34	33. Die Förderung der Eltern	34
35	34. Die Hilfe der Eltern	35
36	35. Die Beratung der Eltern	36
37	36. Die Unterstützung der Eltern	37
38	37. Die Förderung der Eltern	38
39	38. Die Hilfe der Eltern	39
40	39. Die Beratung der Eltern	40
41	40. Die Unterstützung der Eltern	41
42	41. Die Förderung der Eltern	42
43	42. Die Hilfe der Eltern	43
44	43. Die Beratung der Eltern	44
45	44. Die Unterstützung der Eltern	45
46	45. Die Förderung der Eltern	46
47	46. Die Hilfe der Eltern	47
48	47. Die Beratung der Eltern	48
49	48. Die Unterstützung der Eltern	49
50	49. Die Förderung der Eltern	50
51	50. Die Hilfe der Eltern	51
52	51. Die Beratung der Eltern	52
53	52. Die Unterstützung der Eltern	53
54	53. Die Förderung der Eltern	54
55	54. Die Hilfe der Eltern	55
56	55. Die Beratung der Eltern	56
57	56. Die Unterstützung der Eltern	57
58	57. Die Förderung der Eltern	58
59	58. Die Hilfe der Eltern	59
60	59. Die Beratung der Eltern	60
61	60. Die Unterstützung der Eltern	61
62	61. Die Förderung der Eltern	62
63	62. Die Hilfe der Eltern	63
64	63. Die Beratung der Eltern	64
65	64. Die Unterstützung der Eltern	65
66	65. Die Förderung der Eltern	66
67	66. Die Hilfe der Eltern	67
68	67. Die Beratung der Eltern	68
69	68. Die Unterstützung der Eltern	69
70	69. Die Förderung der Eltern	70
71	70. Die Hilfe der Eltern	71
72	71. Die Beratung der Eltern	72
73	72. Die Unterstützung der Eltern	73
74	73. Die Förderung der Eltern	74
75	74. Die Hilfe der Eltern	75
76	75. Die Beratung der Eltern	76
77	76. Die Unterstützung der Eltern	77
78	77. Die Förderung der Eltern	78
79	78. Die Hilfe der Eltern	79
80	79. Die Beratung der Eltern	80
81	80. Die Unterstützung der Eltern	81
82	81. Die Förderung der Eltern	82
83	82. Die Hilfe der Eltern	83
84	83. Die Beratung der Eltern	84
85	84. Die Unterstützung der Eltern	85
86	85. Die Förderung der Eltern	86
87	86. Die Hilfe der Eltern	87
88	87. Die Beratung der Eltern	88
89	88. Die Unterstützung der Eltern	89
90	89. Die Förderung der Eltern	90
91	90. Die Hilfe der Eltern	91
92	91. Die Beratung der Eltern	92
93	92. Die Unterstützung der Eltern	93
94	93. Die Förderung der Eltern	94
95	94. Die Hilfe der Eltern	95
96	95. Die Beratung der Eltern	96
97	96. Die Unterstützung der Eltern	97
98	97. Die Förderung der Eltern	98
99	98. Die Hilfe der Eltern	99
100	99. Die Beratung der Eltern	100

MEINEN ELTERN GEWIDMET



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554611_0061

I N H A L T

		<u>Seite</u>
1	EINLEITUNG	7
2	MATERIAL	10
2.1	Reagenzien	10
2.1.1	Markiertes Hapten	11
2.1.2	Unmarkiertes Hapten	11
2.1.3	Szintillationslösung	11
2.2	Geräte	12
3	METHODEN	13
3.1	Polymerisation	13
3.2	Anti-Cortisol-C 3-Konjugat-Antiserum	13
3.2.1	Darstellung des Cortisol-C 3-Konjugates	13
3.2.2	Immunisierung von Kaninchen	14
3.2.3	Blutentnahme	14
3.2.4	Gamma-Globulin-Fraktion	15
3.3	Anti-Cortisol-C 21-Konjugat-Antiserum	15
3.4	Herstellung von cortisolfreiem Humanserum	16
3.5	Sättigung von cortisolfreiem Humanserum mit Cortisol (Kohle-Trenn-Technik)	16
3.6	Sättigung von cortisolfreiem Humanserum mit Cortisol (Gleichgewichtsdialyse)	17
3.7	Bestimmung des Cortisols im Serum mit immo- bilisiertem Antikörper	18
3.7.1	Bestimmung des Gesamtcortisols	18
3.7.1.1	Prinzip	18
3.7.1.2	Durchführung	18
3.7.2	Bestimmung des diffusiblen Cortisols	19
3.7.2.1	Prinzip	19
3.7.2.2	Durchführung	20
4	ERGEBNISSE	22
4.1	Bestimmung des Gesamtcortisols im Serum	22

1 EINLEITUNG

Das Cortisol im Serum des Menschen kann mit Hilfe semipermeabler Membranen in die diffusible Fraktion des freien Cortisols und in die nichtdiffusible Fraktion des proteingebundenen Cortisols getrennt werden. Normalerweise sind etwa 80-90 % des Gesamtcortisols (Serumkonzentration etwa 10^{-6} mol/l) assoziativ an Proteine gebunden, etwa 60 % an das spezifische Transportprotein CBG (corticosteroid-bindendes Globulin, Transcortin) (Serumkonzentration etwa 10^{-6} mol/l) und etwa 30 % an Albumin (Serumkonzentration etwa 5×10^{-4} mol/l). Die Assoziationskonstanten der Komplexe liegen bei 3×10^7 l/mol und 3×10^3 l/mol (37°C). Die diffusible Fraktion des Cortisols gilt als die "biologisch aktive" Form des Glucocorticoids. Tatsächlich stellt sie die aktuell verfügbare Fraktion dar, während das proteingebundene Cortisol als potentiell verfügbare, gespeicherte Fraktion aufgefaßt werden kann, die u. a. auch dem Stoffwechsel entzogen ist. Die Konzentration des diffusiblen Cortisols unterliegt der hypophysären Regulation; die Gesamtkonzentration des Cortisols wird dagegen auch von der Konzentration der Proteine beeinflusst (5;8;23;24;32;).

Verschiedene Medikamente, z.B. Ovulationshemmer, aber auch Krankheiten und Schwangerschaften, verändern den CBG-Gehalt des Serums und damit die Gesamtcortisol-Konzentration (2;9;10;31;). Da es nicht möglich ist, von der Gesamtcortisol - Konzentration zum Beispiel auf die hypophysäre Regulation zu schließen, wäre

es zweckmäßig, zusätzlich zum Gesamtcortisol auch den Anteil des diffusiblen Cortisols zu bestimmen. Die bislang in Einzelfällen zur Bestimmung des diffusiblen Cortisols eingesetzten Methoden, wie Gleichgewichtsdialyse (2;10;16;22;), Ultrazentrifugation (6;16;22;27;) oder Gelchromatographie (6) benötigen jedoch soviel Arbeitsaufwand und Zeit, daß sie für eine serielle und maschinelle Probenverarbeitung nicht in Frage kommen. Es war Ziel der vorliegenden Arbeit, eine einfache, wenig zeitaufwendige, jedoch zuverlässige Bestimmungsmethode sowohl des Gesamtcortisols wie auch des diffusiblen Cortisols zu entwickeln.

Ein maßgebliches Hindernis, das Gesamtcortisol direkt, d.h. ohne vorherige, aufwendige Extraktion der Steroide immunchemisch zu bestimmen, besteht darin, daß das CBG der Probe mit dem zugesetzten Antikörper um die Bindung des Cortisols konkurriert. Bisher wurde zur Ausschaltung des CBG neben der Cortisol-Extraktion mit organischen Lösungsmitteln (4;21;) hauptsächlich die Hitzedenaturierung (11;15;25;) angewandt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Tatsache ausgenützt, daß durch Ansäuern der Probe die Bindung des Transportproteins zum Cortisol zerstört wird (3;28;), die Bindung des Antikörper zum Cortisol dagegen wenig beeinträchtigt wird (20). Zur Cortisol-Bestimmung wurden die Vorteile des Radioimmunoassays und der Festphasen-Technik kombiniert und die Eigenschaften semipermeabler Membranen ausgenützt (14;17;). Anti-Cortisol-C 3-Konjugat-Antikörper wurden durch Einschluß in eine Acrylamid-

Matrix immobilisiert. Das poröse Antikörper-Gel schließt Makromoleküle aus, läßt freie Steroide jedoch ungehindert zum eingeschlossenen Antikörper diffundieren (26). Mit diesem Hilfsmittel wurde eine einfache Methode entwickelt, um direkt im Serum das diffusible Cortisol bei physiologischer Wasserstoff-Ionenkonzentration und das Gesamtcortisol nach Ansäuern zu bestimmen.

2 MATERIAL

2.1 Reagentien

Cortisol (Δ^4 -Pregnen- 11β , 17α , 21 -triol- 3 , 20 -dion) von der Firma E. Merck, Darmstadt, Deutschland.

($1,2,6,7$ - ^3H) Cortisol (91 Ci/mmol) von New England Nuclear Corporation, Boston, Mass., USA, wird chromatographisch über Sephadex LH-20 gereinigt; Sephadex LH-20 ist ein Handelsprodukt der Firma Pharmacia, Uppsala, Schweden.

$2,5$ -Diphenyloxazol (PPO) und $1,4$ -bis- 2 -(4 -methyl- 5 -phenyl-oxazolyl)-benzol der Firma W. Zinsser, Frankfurt, Deutschland.

Bio-Solv (BBS-3) der Beckmann-Instruments-GmbH, München, Deutschland.

Acrylamid, Methacrylsäure von E. Merck, Darmstadt, Deutschland.

N,N' -Methylenbisacrylamid von Bio Rad GmbH, München, Deutschland.

N,N,N',N' -Tetramethyläthylendiamin und Riboflavin von Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland.

Es wird eine Phosphatpufferlösung ($1/15$ mol/l) mit einem pH von $7,2$, die $5,0$ mmol/l NaN_3 enthält, und eine Na-Acetatpufferlösung ($1/1,5$ mol/l) mit einem pH von $3,9$ verwendet.

Die Dextran-Kohle-Lösung enthält $0,5$ g Norit A, $0,05$ g Dextran in $100,0$ ml Phosphatpuffer (pH $7,2$) gelöst und wird ständig bei 4°C gerührt; Norit A ($4-5\ \mu\text{m}$) von Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland; Dextran T 70 von Pharmacia, Uppsala, Schweden. Alle wässrigen Lösungen werden mit "aqua pro injectione" von B. Braun, Melsungen, Deutschland zubereitet.

2.1.1 Markiertes Hapten

³H-Cortisol wird nach Reinigung in Benzol/Äthanol (90:10) gelöst, die Stammlösung (30,0 ng/ml) wird bei -20 °C aufbewahrt. Arbeitslösungen werden durch Eindampfen eines bestimmten Volumens der Stammlösung mit Stickstoff und Lösen des Rückstandes in Phosphatpuffer (pH 7,2) oder in Na-Acetatpuffer (pH 3,9) bereitet und über Nacht stehen gelassen. Bis zur endgültigen Verwendung werden diese Arbeitslösungen bei 4 °C aufbewahrt.

2.1.2 Unmarkiertes Hapten

Eine Stammlösung (1,0 µg/ml) wird durch Einwägen des Cortisols auf einer Elektrowaage der Fa. Ventron Instruments Cooperation, Paramount, California, USA und Lösen in spektralreinem Äthanol (Uvasol) bereitet. Aus dieser werden Arbeitslösungen gewonnen, indem definierte Volumina mit Stickstoff eingedampft werden und der Überstand über Nacht mit Phosphatpuffer (pH 7,2) oder Na-Acetatpuffer (pH 3,9) gelöst wird. Sie werden bei 4 °C bis zur endgültigen Verwendung aufbewahrt.

2.1.3 Szintillationslösung

100,0 g PPO und 1,25 g POPOP werden in 1,0 l Toluol gelöst. Von dieser Lösung werden 42,0 ml mit 117,0 ml Biosolv zu 1,0 l Toluol gegeben und gemischt. Jedem Szintillationsgläschen werden 15,0 ml dieser Lösung zugesetzt. Als Szintillationszähler wird das Packard-Modell 2425 benützt. Gezählt wird 2-4 min.

2.2 Geräte

Dialysegerät Dianorm von der Fa. Bachhofer, Reutlingen, Deutschland.

+ 2 Kolbenpumpen (Fördergeschwindigkeit: 0,5 ml/min).

+ Thermoblöcke aus Messing, 10 Bohrungen ($\varnothing$ 7,0 mm), für Säulchen.

+ Thermo-Filtrationstrennblock aus Messing mit 10 Bohrungen ($\varnothing$ 16,0 mm, maximales Volumen pro Bohrung: 1,7 ml), deren Ausgänge mit 2 Filterpapierscheiben und einer Andruckschraube mit einer feinen zentralen Bohrung abgeschlossen werden.

Thermostat (Typ K 4 R) und Kryostat (Typ N B S 15) des Meßgerätekwerks Lauda, Tauber, Deutschland.

Mikroliterzentrifuge (max. Beschleunigung ca. 10500 g) von der Fa. Hettich, Tuttlingen, Deutschland.

Schüttler von der Fa. Eppendorf Gerätebau, Hamburg, Deutschland.

Filter von der Fa. Schleicher & Schüll.

Dichtungen: Viton-Ringe.

Spritzenkolben: Einmalspritzen der Fa. Henke, 178 71-C-10.

Semipermeable Membran: Spectrum Medical Industr. Inc., USA.

Reaktionsgefäße (1,5 ml) der Fa. Eppendorf Gerätebau, Hamburg, Deutschland.

Säulchen der Fa. KE Plastik, München, Deutschland.

UV-Lampe: Ultra Vitalux GUR 53 (220 V, 300 W) von der Fa. Osram, Berlin, Deutschland.

+ nach Angaben hergestellt in der Zentralwerkstatt des SFB 51

3 METHODEN

3.1 Polymerisation

Zur Polymerisation wurden Monomere in der Konzentration $T=2,94$ mol/l eingesetzt. Für einen Ansatz werden 3,0 g Acrylamid (42,2 mmol), 2,0 g Methacrylsäure (23,3 mmol) und 1,25 g N,N'-Methylenbisacrylamid (8,1 mmol) im Becherglas in 22,5 ml Phosphatpuffer (pH 7,2) gelöst. Nachdem 2,5 ml der Gammaglobulin-Verdünnung (1+19 mit Phosphatpuffer verdünnt) dazugegeben wurden, wird die Reaktion mit 0,15 mg Riboflavin, 0,10 ml N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin und UV-Bestrahlung (300 W) gestartet. Während der Reaktionszeit von etwa 45 min wird die Temperatur unter 50°C gehalten. Anschließend wird der Gelblock zerkleinert und durch ein Gitter mit einer Maschengröße von $400\text{ }\mu\text{m}$ gedrückt. Die Gelkörner werden auf einer Nutsche gründlich mit aqua dest. gewaschen und dann mit Aceton aufgeschlämmt. Nach dem Absaugen des Acetons werden die Polymerisate an der Luft getrocknet und bei 4°C aufbewahrt.

3.2 Anti-Cortisol-C 3-Konjugat-Antiserum

3.2.1 Darstellung des Cortisol- C 3-Konjugates

Cortisol-3-carboxymethyl-oxim wurde nach Fahmy, Lead und Hillier dargestellt (13). 700,0 mg (1,93 mmol) Cortisol wurden mit 700,0 mg (7,69 mmol) Carboxymethoxylamin in 100,0 ml 50 % gesättigter, methanolischer Natrium-Bicarbonat-Lösung gelöst, ca.

20 min bei Raumtemperatur gerührt und zweimal mit Diäthyläther extrahiert. Die Ätherextrakte wurden im Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht, in wenig Aceton gelöst und mit einem Aceton/Hexan-Gemisch kristallisiert. (Schmelzpunkt: 216-220 °C). Die Kopplung von Cortisol-3-carboxymethyl-oxim an Albumin erfolgte nach der gemischten Anhydrid-Methode nach Erlanger, Borek, Beiser und Liebermann (12).

3.2.2 Immunisierung von Kaninchen

Kaninchen wurden gegen Cortisol immunisiert. Als Antigen wurde Cortisol-3-(o-carboxymethyl) oxim-Albumin-Konjugat verwendet. 2,0 mg Antigen in 0,4 ml 0,01 m Tris (tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)-Puffer (pH 7,5) (5 mmol/l NaN_3) wurden mit 0,4 ml komplettem Freund'schen Adjuvans emulgiert. Zur Immunisierung wurden 0,2 ml der Emulsion in jede der vier Pfoten gespritzt. Nach vier Wochen wurde die erste Boosterung durchgeführt, indem 2,0 mg Antigen in der beschriebenen Pufferlösung mit dem gleichen Betrag von inkomplettem Freund'schen Adjuvans emulgiert, die Emulsion in vier gleiche Volumina geteilt und zwei i.m. und zwei s.c. injiziert wurden. Die zweite Boosterung erfolgte eine Woche später auf dieselbe Art.

3.2.3 Blutentnahme

Blut wurde aus der Ohrvene der Kaninchen entnommen; die erste

Probenahme eine Woche nach der zweiten Boosterung, die zweite eine Woche später. Die Blutproben wurden nach der Gerinnung zentrifugiert und bei -20°C aufbewahrt.

3.2.4 Gamma-Globulin-Fraktion

Gleiche Volumina Antiserum und 70 %ig gesättigte Ammoniumsulfatlösung wurden miteinander vermischt, so daß eine 35 %ige Ammoniumsulfatlösung entstand (pH 7,2-7,6). In dieser Lösung fallen die Gamma-Globuline bei Zimmertemperatur innerhalb von vier Stunden aus. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, der Niederschlag in destilliertem Wasser aufgenommen und dann das gleiche Volumen 70 %ig gesättigte Ammoniumsulfatlösung zugegeben. Auf diese Weise wurde eine dreimalige Fällung vorgenommen. Nach der dritten Fällung wurde der Niederschlag gegen 0,85 %ige NaCl-Lösung (pH 8,0) dialysiert, bis kein Sulfat mehr im Dialysat nachzuweisen war. Anschließend wurde mit 0,85 %iger Kochsalzlösung auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt. Davon ausgehend wurde durch Verdünnung von 1+19 mit Phosphatpuffer eine Gamma-Globulin-Lösung hergestellt, von der je 2,5 ml zur Polymerisation verwendet wurden.

3.3 Anti-Cortisol-C 21-Konjugat-Antiserum

Das Anti-Cortisol-C 21-Konjugat-Antiserum wurde uns freundlicherweise von Priv. Doz. Dr. Bidlingmaier, Universitätskin-

derklinik im Dr. v. Haunerschen Kinderspital, München, zur Verfügung gestellt.

3.4 Herstellung von cortisolfreiem Humanserum

2,0 ml Humanserum wurden mit 1,0 ml Dextran-Kohle-Lösung versetzt und 24 h bei einer Temperatur von 23 °C inkubiert. Dann wurde zentrifugiert und der Überstand noch zweimal in derselben Weise behandelt. In einem Kontrollversuch wurde Humanserum ^3H -Cortisol (250 000 cpm) zugesetzt ($T=23\text{ }^{\circ}\text{C}$; 24 h) und wie oben mit Dextran-Kohle-Lösung inkubiert und zentrifugiert, um die Entfernung des Cortisols aus dem Serum aufzuzeigen (weniger als 3-4 % Restradioaktivität).

3.5 Sättigung von cortisolfreiem Humanserum mit Cortisol und Trennung des Liganden vom Ligand-Protein-Komplex mit Hilfe von Adsorbens (Dextran-Kohle-Lösung)

0,25 ml mit Phosphatpuffer verdünntes (1+5), cortisolfreies Humanserum wurden mit 0,25 ml ^3H -Cortisol-Lösung in ansteigenden Konzentrationen (5,18-82,87 nmol/l) 60 min bei $T=23\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurde in die Bohrungen des Filtrations-trennblokes Adsorbens (0,3 ml Dextran-Kohle-Lösung) vorgelegt, das Inkubationsgemisch dazugegeben und die Lösung mit dem Spritzenkolben durch das Adsorbens und die Filter gedrückt. Die Kon-

taktzeit betrug ca. 3-5 sec, die Reaktionstemperatur 0 °C. Das Filtrat enthält das proteingebundene ^3H -Cortisol; dieses wurde in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt. Davon wurde ein Aliquot (0,5 ml) mit 15 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und die Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillator gemessen. Aus den Impulsen/min (cpm) wird die Konzentration des an das Transportprotein gebundenen ^3H -Cortisols errechnet.

3.6 Sättigung von cortisolfreiem Humanserum mit Cortisol und Trennung des Liganden vom Ligand-Protein-Komplex durch die Gleichgewichtsdialyse

0,2 ml cortisolfreies Humanserum, das mit Phosphatpuffer 1+11 verdünnt wurde, wurden jeweils in die eine Kammer der Dialysezellen und 0,2 ml ^3H -Cortisol-Lösung in ansteigenden Konzentrationen (9,03-56,96 nmol/l) in die andere Kammer pipetiert. Zur Inkubation wurden die Zellen 90 min bei einer Temperatur von 0-4 °C rotierend bewegt. Dann wurden Aliquote aus beiden Kammern (0,1 ml) in Szintillationsgläschen gegeben, mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und die Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillator gemessen. Aus der Differenz der Impulse/min (cpm) der beiden Kammern und der bekannten Ausgangskonzentration des Indikatorhaptens ^3H -Cortisol läßt sich der an das Transportprotein gebundene und der nicht gebundene Anteil des Cortisols berechnen.

3.7 Bestimmung des Cortisols im Serum mit immobilisiertem Antikörper

3.7.1 Bestimmung des Gesamtcortisols

3.7.1.1 Prinzip

Cortisol liegt im Serum zu 80-90 % an Proteine (CBG und Albumin) gebunden vor (5). Bei der Bestimmung des Gesamtcortisols im Serum ist es notwendig, die Bindung des Cortisols an Proteine zu zerstören, da die Proteine im Radioimmunoassay mit dem Antikörper um die Bindung des Cortisols konkurrieren würden. Aus diesem Grunde wird Serum mit Na-Acetatpuffer-Lösung (pH 3,9) angesäuert. Nach Zugabe von ^3H -Cortisol zum angesäuerten Serum können nun bei der Inkubation das Serumcortisol, das vom CBG abgetrennt wurde, und das markierte Cortisol um den Antikörper konkurrieren. Nach Einstellung des Gleichgewichtes ($\text{C} + \text{C}^+ \xrightleftharpoons{\quad} \text{CAk} + \text{C}^+\text{Ak}$) erfolgt die Trennung des antikörpergebundenen und des nicht gebundenen Cortisols durch Elution mit Pufferlösung.

3.7.1.2 Durchführung der Bestimmung des Gesamtcortisols im Serum mit immobilisiertem Antikörper

Shulchen mit 60,0 mg trockenem Anti-Cortisol-Antikörper-Gel befinden sich in einem Thermoblock, der mit einem Kryostaten auf $0^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ oder mit einem Thermostaten auf $23^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ gehalten wird. 0,2 ml Inkubationslösung werden mit der Pumpe "b" angesaugt. Die Inkubationslösung enthält in Na-Acetatpuffer-

Lösung ^3H -Cortisol (5,05 nmol/l) und 0,1 ml Serumprobe (in einem Gesamtvolumen von 4,8 ml; Verdünnung 1+47) oder für die Eichkurve Cortisol in ansteigender Konzentration (1,50-40,35 nmol/l). Die Säulchen werden nach einer Inkubationszeit von 30 min mit Phosphatpuffer-Lösung eluiert. Das Eluat (1,5 ml bei 3 min Elutionsdauer) wird in Szintillationsgläschen aufgefangen, mit 15,0 ml Szintillationslösung versetzt und die Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillator gemessen. Aus den Impulsen/min (cpm) wird die Konzentration des freien Indikatorhaptens ^3H -Cortisol errechnet. Auf der gewonnenen Dosis-Wirkungs-Kurve wird dann der Cortisolgehalt der Serumprobe abgelesen.

3.7.2 Bestimmung des diffusiblen Cortisols

3.7.2.1 Prinzip

Im Serum befindet sich das Cortisol entsprechend dem Massenwirkungsgesetz mit dem Transportprotein CBG im thermodynamischen Gleichgewicht ($\text{C} + \text{CBG} \rightleftharpoons \text{CCBG}$). Wird Serum auf trockenes Anti-Cortisol-Antikörper-Gel aufgegeben, so beginnt die Matrix zu quellen. Das diffusible Cortisol verteilt sich hauptsächlich auf das innere Gelkornvolumen V_i , das etwa 75-85 % des Gesamtgelvolumens einnimmt; das an das CBG gebundene Cortisol bleibt bleibt im Außerkornvolumen V_a (15-25 %), da in die Poren der Matrix nur kleine Moleküle eintreten können. Während des Quellvorganges hat die Reaktion des Cortisols mit dem Antikörper be-

reits begonnen ($C + Ak \rightleftharpoons CAk$). Anschließend erfolgt die Elution, die so lange durchgeführt wird, bis das äußere Gelkornvolumen V_a , das unter anderem das CBG und den Cortisol-CBG-Komplex enthält, eluiert ist. Durch die Elution, die nur V_a erfasst, werden 15-25 % vom diffusiblen Cortisol aus dem Gel ausgewaschen. Wird diese Elution des Cortisol-CBG-Komplexes mit einer Lösung durchgeführt, die markiertes Cortisol enthält, kann in einer zweiten Reaktion der noch nicht vom unmarkierten Cortisol komplexierte Antikörper mit markiertem Cortisol erfasst werden. Die Menge dieses Antikörpers ist dem Cortisol der Probe umgekehrt proportional. Die Reaktionen des nicht markierten Cortisols und des markierten Cortisols mit dem Antikörper laufen nacheinander ab. Es muß bei der Inkubation mit dem markierten Cortisol nicht die Einstellung des Gleichgewichtes abgewartet werden. Nach einer Zeit von zehn Minuten kann die Trennung des antikörpergebundenen und des nicht gebundenen Cortisols durch Elution mit Pufferlösung erfolgen.

3.7.2.2 Durchführung der Bestimmung des diffusiblen Cortisols

Säulchen mit 60,0 mg trockenem Anti-Cortisol-Antikörper-Gel befinden sich in einem Messing-Thermoblock, der mit einem Kryostaten auf $0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ gekühlt wird. Mit der Pumpe "a" werden 0,3 ml Inkubationslösung ($T=4^{\circ}\text{C}$) angesaugt. Die Inkubationslösung enthält in Phosphatpufferlösung 0,1 ml Serum-

probe (in einem Gesamtvolumen von 1,2 ml; Verdünnung 1+11) oder für die Eichkurve Cortisol in ansteigender Konzentration (1,86-58,86 nmol/l). Mit der Pumpe "a" wird nach einer Quellungszeit von 4 Minuten mit ^3H -Cortisol-Lösung (8,53 nmol/l) eluiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten mit dem ^3H -Cortisol wird das freie, nicht antikörpergebundene Cortisol mit Phosphatpufferlösung eluiert (Pumpe "b"). Das Eluat (1,5 ml bei 3 min Elutionsdauer) wird in Szintillationsgläsern aufgefangen, mit 15,0 ml Szintillationslösung versetzt und die Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillator gemessen. Aus den Impulsen/min (cpm) wird die Konzentration des freien Indikatorhaptens ^3H -Cortisol errechnet. Auf der Dosis-Wirkungskurve wird dann der Gehalt des diffusiblen Cortisols im Serum abgelesen.

4 ERGEBNISSE

4.1 Bestimmung des Gesamtcortisols im Serum

Die Kreuzreaktivität des Anti-Cortisol-C 3-Konjugat-Antiserums mit verschiedenen Haptenen wurde mit der Kohle-Trenn-Technik ermittelt (Tab.1.)

Cortisol	100,0	%
21-Desoxycortisol	1,4	%
Corticosteron	1,024	%
Cortison	1,0	%
Progesteron	0,088	%
17-OH-Progesteron	0,011	%
Testosteron	0,0	%

Tab.1. Spezifität des Anti-Cortisol-C 3-Konjugat-Antiserums (Tier Nr.53). Die Kreuzreaktivität K (in %) ist definiert:

$$K = \frac{100 \times \text{benötigte Masse des korrespond. Haptens für } y=50}{\text{benötigte Masse des kreuzreagierenden Haptens für } y=50}$$

y = Bindung des Indikatorhaptens an das Antiserum (in %)

Die Monomerkonzentration der Antikörpermatrix betrug 2,94 mol/l, so daß eine Porengröße von ca. 0,8-1,0 nm erreicht wurde (18).

Die Gelkorngröße beträgt ca. 400 µm. Bei einer Fördergeschwindigkeit von 0,5 ml/min sind nach 4 min 92 % der freien Haptene eluiert (Abb.1.).

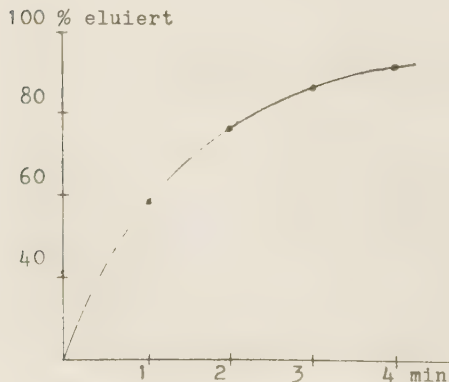


Abb.1. Elution von ^3H -Cortisol (80 000 cpm) aus 60 mg Acrylamid-Gel ohne eingeschlossenen Antikörper in Abhängigkeit von der Zeit. Gelkorngröße: 400 µm; Fördergeschwindigkeit: 0,5 ml/min.

Die Konkurrenz von ^3H -Cortisol an immobilisierte Anti-Cortisol-Antikörper ist in den Abb. 2-4 dargestellt. In Abb. 2. werden die Affinitäten des Anti-Cortisol-C 3-Konjugat-Antikörpers und des Anti-Cortisol-C 21-Konjugat-Antikörpers zu Cortisol verglichen. Beide Antikörper sind in der gleichen Matrix eingeschlossen.

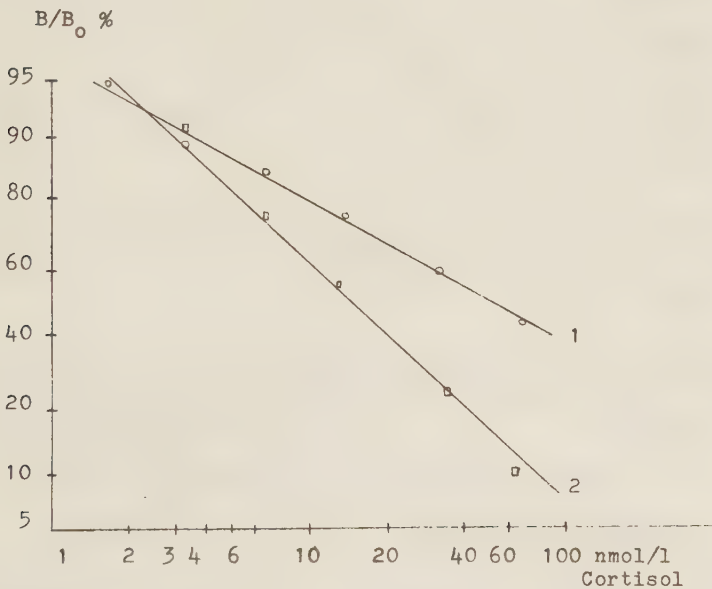


Abb. 2. Konkurrenz der Bindung von ^3H -Cortisol an immobilisierte Anti-Cortisol-Konjugat-Antikörper (pH 3,9; $T=0^\circ\text{C}$). Dosis-Wirkungs-Kurve des Cortisols
Acrylamid-Matrix mit 40 %igem Methacrylsäureanteil mit immobilisiertem
1 Anti-Cortisol-C 21-Konjugat-Antikörper ($B_0=37\ 000$)
2 Anti-Cortisol-C 3-Konjugat-Antikörper ($B_0=41\ 000$)

Die Werte in Klammern stellen B_0 (cpm) dar.

Die Affinität des immobilisierten Anti-Cortisol-C 3-Konjugat-Antikörpers zu Cortisol zeigen bei unterschiedlichen pH-Werten und Temperaturen die Abb. 3 und 4. In Abb.3. ist die Inkubation bei pH 7,2 und bei pH 3,9 ($T=0^{\circ}\text{C}$), in Abb.4. bei den Temperaturen 0°C und 23°C ($\text{pH}=3,9$) dargestellt.

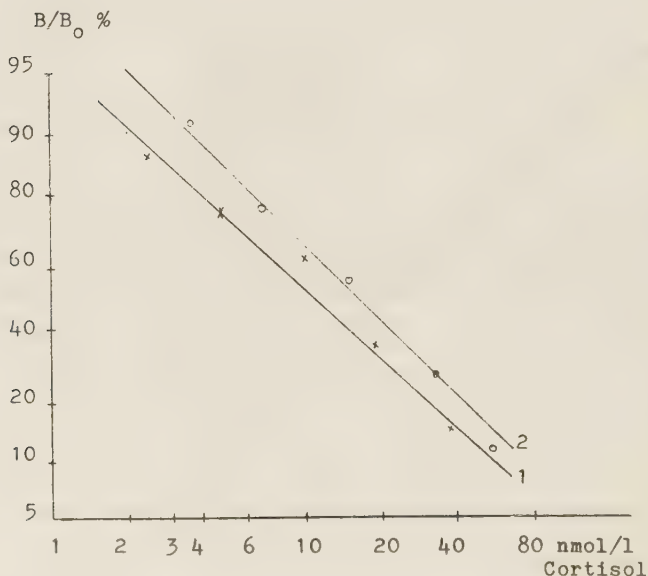


Abb.3. Kompetition der Bindung von ^3H -Cortisol an immobilisierte Anti-Cortisol-C 3-Konjugat-Antikörper (Acrylamid-Matrix mit 40 %igem Methacrylsäureanteil; $T=0^{\circ}\text{C}$).

Dosis-Wirkungs-Kurve des Cortisols

Inkubation bei

1 pH 7,2 ($B_0=41\ 000$; $q=17,3$)

2 pH 3,9 ($B_0=41\ 000$; $q=15,8$)

Die Werte in Klammern stellen B_0 (cpm) und q (Konzentration der ^3H -Cortisol-Bindungsstellen des immobilisierten Antikörpers in nmol/l) dar.

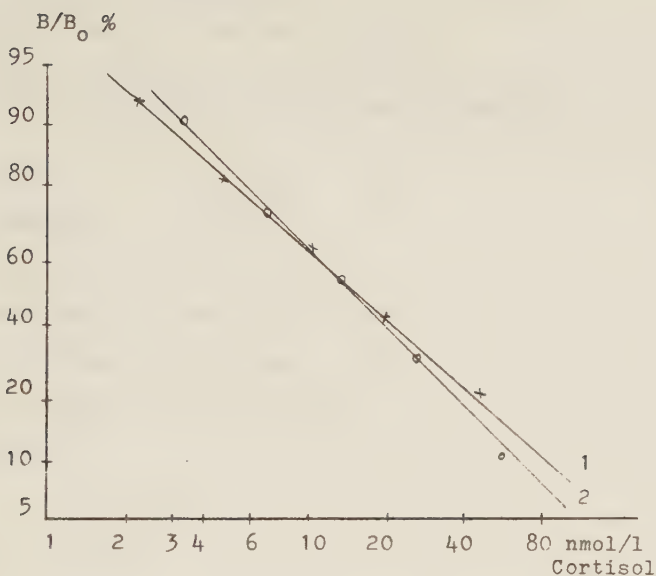


Abb.4. Konkurrenz der Bindung von ^3H -Cortisol an immobilisierte Anti-Cortisol-C 3-Konjugat-Antikörper (Acrylamid-Matrix mit 40 %igem Methacrylsäureanteil; pH-Wert 3,9).

Dosis-Wirkungs-Kurve des Cortisols
Inkubation bei einer Temperatur von

1 $T = 23^\circ\text{C}$ ($B_0 = 46\,000$; $q = 12,2$)

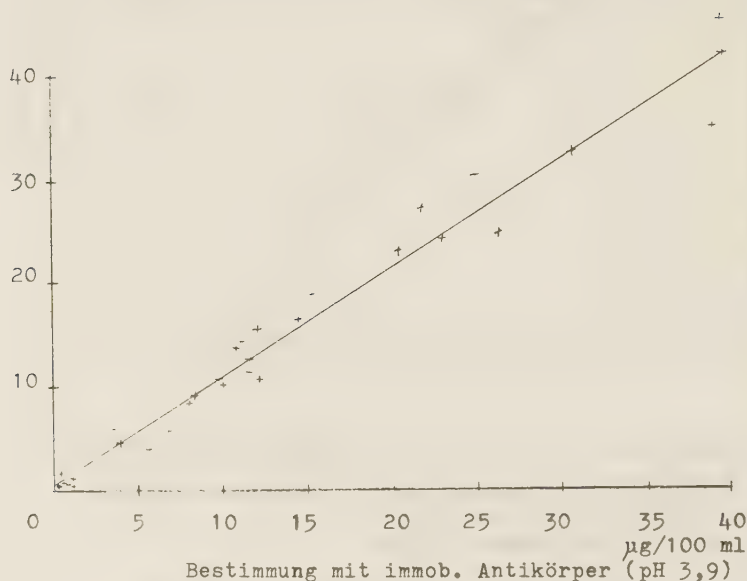
2 $T = 0^\circ\text{C}$ ($B_0 = 41\,000$; $q = 15,8$)

Die Werte in Klammern stellen B_0 (cpm) und q (Konzentration der ^3H -Cortisol-Bindungsstellen des immobilisierten Antikörpers in nmol/l) dar.

Die Korrelation von Cortisolbestimmungen im Serum mit immobilisiertem Anti-Cortisol-C 3-Konjugat-Antikörper im Vergleich zu Bestimmungen mit mobilem Antikörper, die mit der Methode der Kohle-Trenn-Technik nach vorhergehender Extraktion des Serums erzielt wurden, zeigt Abb.5.

Bestimmung mit mobilem Antikörper (pH 7,2)

50 - $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$



$$y = 0,767588 + 1,025075 x;$$

Abb.5. Vergleich von Gesamtcortisolbestimmungen im Serum mit immobilisiertem Antikörper (x-Achse) bei $T=0^\circ \text{C}$ und einem pH von 3,9 und einer Methode, bei der vor der Bestimmung ein Extraktionsschritt durchgeführt wurde und die Trennung mit Hilfe von Adsorbens (Dextran-Kohle-Lösung) bei $T=0^\circ \text{C}$ und einem pH von 7,2 erfolgte (y-Achse). Anzahl der Proben: $n=31$; Korrelationskoeffizient: $R=0,970335$.

Ergebnisse im Ringversuch

Bei der fortlaufenden externen Qualitätskontrolle der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie (3. Hormon-Ringversuch I vom Februar 1977) lagen die Meßwerte für das Gesamt-

cortisol im Vertrauensbereich (mikromol/l):

Meßwert A=0,247; Sollwert=0,230 $\pm$ 0,023 ($\bar{x}\pm s$); Abweichung=+0,74;

Meßwert B=0,555; Sollwert=0,530 $\pm$ 0,053 ($\bar{x}\pm s$); Abweichung=+0,47;

Präzision

Bei einem Serum wurde die Qualitätskontrolle von Tag zu Tag vorgenommen. Der Mittelwert lag bei 18,5 $\pm$ 1,9 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ Gesamtcortisol ($\bar{x}\pm s$). Der Variationskoeffizient betrug 10,3 % ($n=23$).

4.2 Bestimmung des diffusiblen Cortisols im Serum

Den Einfluß ansteigender ^3H -Cortisol-Konzentrationen (5,5; 6,9; 8,5 nmol/l) auf die Dosis-Wirkungs-Kurve des Cortisols bei der Folge-Inkubation zeigt Abb.6.

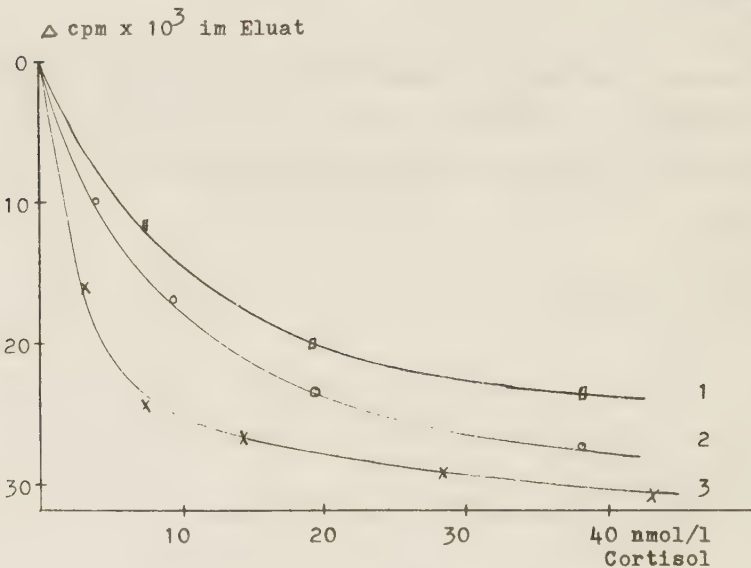


Abb.6. Konkurrenz der Bindung von ^3H -Cortisol an immobilisierte Anti-Cortisol-C 3-Konjugat-Antikörper (Acrylamid-Matrix mit 40 %igem Methacrylsäureanteil; pH 7,2; T=0 °C). Dosis-Wirkungs-Kurve des Cortisols Folge-Inkubation mit ^3H -Cortisol-Konzentrationen von 1 = 5,5 nmol/l; 2 = 6,9 nmol/l; 3 = 8,5 nmol/l.

Enthalten die Serumproben CBG, so muß gesichert sein, daß der Transportprotein-Cortisol-Komplex vollständig aus dem Antikörpergel eluiert wird. Wie Abb.7. zeigt, genügen 0,6-0,7ml, um auch den hohen CBG-Gehalt von Graviden Serum aus dem Gel zu entfernen.

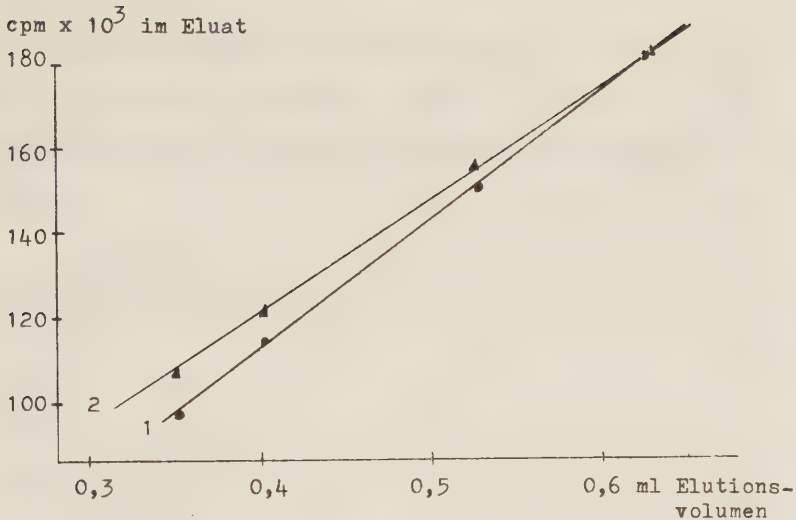


Abb. 7. Elution von ^3H -Cortisol aus 60 mg Antikörpergel (Acrylamidmatrix mit 40 %igem Methacrylsäureanteil) in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen; in Anwesenheit von 0,3 ml Phosphatpuffer (1) oder von 0,3 ml cortisolfreiem Humanserum (2). $T=0^\circ\text{C}$; pH 7,2.

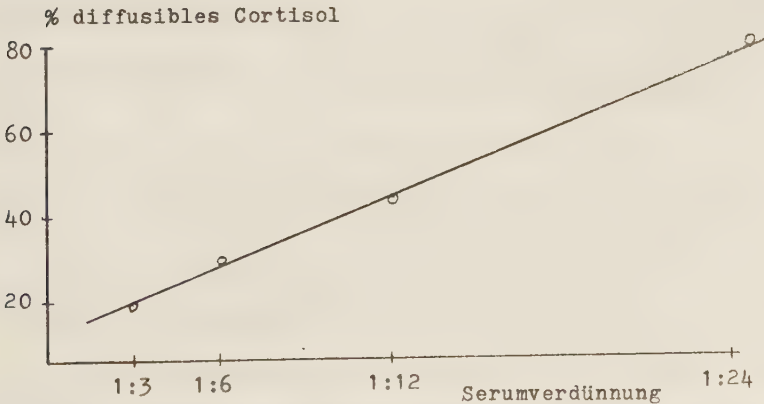


Abb. 8. Abhängigkeit der Konzentration des diffusiblen Cortisols von der Serumverdünnung bei sonst konstanten Versuchsbedingungen (Acrylamid-Matrix mit 40 %igem Methacrylsäureanteil mit immobilisiertem Anti-Cortisol-C β -Konjugat-Antikörper; pH 7,2; $T=0^\circ\text{C}$)
x-Achse: Serumverdünnung im Inkubationsansatz;
y-Achse: diffusibles Cortisol (in % des Gesamtcortisols).

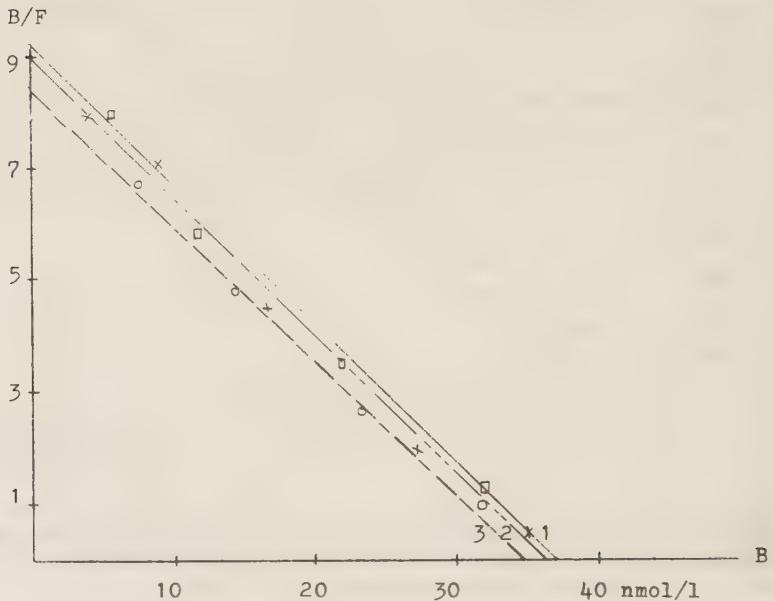


Abb.9. Sättigung von cortisolfreiem Humanserum mit Cortisol (Scatchard-Antragung), bei einem pH von 7,2 und $T=0^{\circ}\text{C}$ und Trennung des Cortisols vom Cortisol-Transportprotein-Komplex
1 mit Adsorbens (Kohle-Trenn-Technik)
2 mit immobilisiertem Anti-Cortisol-C β -Konjugat-Antikörper
3 mit der Gleichgewichtsdialyse

Bei Versuchen mit gleichen Volumina des Inkubationsgemisches, aber wechselndem Serumgehalt, zeigte sich bei sonst konstanten Versuchsbedingungen eine deutliche Abhängigkeit des Anteils des diffusiblen Cortisols von der Serumverdünnung (Abb.8.). Die Sättigung von cortisolfreiem Humanserum mit Cortisol ist in Abb.9. in der Scatchard-Antragung dargestellt. Es wurden Bestimmungen mit einem Adsorbens (Kohle-Trenn-Technik), mit der Gleichgewichtsdialyse und mit immobilisiertem Antikörper

verglichen. Die Assoziationskonstante (K_{ass}) des Transportproteins (CBG) für ^3H -Cortisol, ermittelt mit den drei verschiedenen Techniken, wurde aus Scatchard-Diagrammen erhalten (Tab.2.).

Tab.2.	Kohle-Trenn-Technik	immob.Antikörper	Dialyse
K_{ass}			
$\times 10^8$	2,5	2,5	2,4
(l/mol)			

Tab.2. Die Assoziationskonstante (K_{ass}) der Bindungsreaktion von ^3H -Cortisol mit dem Transportprotein (CBG), ermittelt mit der Kohle-Trenn-Technik, mit immobilisiertem Antikörper und mit der Gleichgewichtsdialyse ($T=0^\circ\text{C}$).

Diffusible Cortisol-Serumwerte von verschiedenen Patientengruppen sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Diffusibles Cortisol	Normal	Dexamethason-Suppression	ACTH-Stimulation	Schwangerschaft
($\mu\text{g}/100\text{ml}$)	$2,3 \pm 1,0$	$1,3 \pm 1,2$	$7,2 \pm 4,2$	$4,4 \pm 0,7$

Tab.3. Konzentration des diffusiblen Cortisols im Serum unter verschiedenen Bedingungen ($\bar{x} \pm s$).

Präzision

Bei einem Serum wurde die Qualitätskontrolle von Tag zu Tag vorgenommen. Der Mittelwert lag bei $2,2 \pm 0,3 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ diffusiblen Cortisol. Der Variationskoeffizient betrug 14,7 % ($n=18$).

5 DISKUSSION

Zur Bestimmung von Cortisol sind bisher meist Anti-Cortisol-C 21-Konjugat-Antikörper eingesetzt worden, die mit strukturell verwandten Steroiden hohe Kreuzreaktivitäten zeigten (11;20; 21;). Diese Antikörper binden Steroide, ohne Substituenten an C-17 zu erkennen, da die Region des Haptens, die im Antigen vom Brückenglied zum Trägermolekül besetzt war, von Antikörperbindungen ausgespart bleibt. Dash und Mitarb. (4) und Fahmy und Mitarb. (13) zeigten, daß Antikörper gegen Anti-Cortisol-C 3-Konjugate, die den ganzen Ring D und die C-17-Kette des Cortisolmoleküls dem antigenerkennenden System frei aussetzen, eine höhere Spezifität für Cortisol besitzen. Unsere Versuche bestätigten dies (Tabelle 1). Es erschien daher vorteilhaft, Cortisolbestimmungen mit dem Cortisol-C 3-Konjugat-Antikörper durchzuführen. Die Affinitätskonstante des immobilisierten Anti-Cortisol-C 3-Konjugat-Antikörpers zu ^3H -Cortisol lag bei $1,0 \times 10^8$ l/mol. Dash und Mitarb. (4) und Fahmy und Mitarb.(13) gaben für den mobilen Anti-Cortisol-C 3-Konjugat-Antikörper Affinitätskonstanten von $1,8 \times 10^9$ l/mol und $0,8 \times 10^9$ l/mol an. Die Affinitätsminderung unseres Antikörpers ist wohl durch seine Immobilisierung verursacht.

5.1 Diskussion der Bestimmung des Gesamtcortisols im Serum

Die Methode, durch Ansäuerung von Serumprobe Cortisol aus der Bindung mit seinem Transportprotein freizusetzen, ist einfach auszuführen und wenig zeitaufwendig, da lediglich Na-Acetat-Pufferlösung (pH 3,9) der Serumprobe zugesetzt werden muß. Zur Prüfung des Cortisol-Bindungsvermögens vom CBG nach Ansäuerung der Probe, wurde ^3H -Cortisol cortisolfreiem Humanserum zugesetzt und nach Zugabe von Na-Acetat-Pufferlösung der an das CBG gebundene Anteil des Indikatorhaptens mit der Kohle-Trenn-Technik bestimmt. Nur 2 % des eingesetzten Indikatorhaptens lagen an das CBG gebunden vor.

Die beschriebene Säureabhängigkeit der Cortisol-Bindungsstellen des Transportproteins ließ auch eine Affinitätsminderung des Antikörpers zum Cortisol erwarten. Beide Proteine müßten auf eine pH-Verschiebung ähnlich reagieren, da die Bindung des Cortisols zum Antikörper wie auch zum CBG hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen verursacht wird (29). Im Vergleich zur Inkubation im neutralen Milieu war jedoch die Affinitätsminderung des Antikörpers zum Cortisol im sauren Milieu verhältnismäßig gering (28 %), so daß sie wegen der einfachen Durchführung der Hormonfreisetzung vom Transportprotein in Kauf genommen wurde (Abb.3.). Wie auch Rollerl und Mitarb. (20) annehmen, besteht offenbar beim α_1 -Glycoprotein CBG ein strengerer Zusammenhang von Struktur und Bindungsvermögen als beim IgG-Globulin, bei dem eine Entfaltung der Molekülketten in Gegenwart von H-Ionen die Anzahl der Bindungsstellen wenig

beeinflusst.

Es wurde auch die Temperaturabhängigkeit der Reaktion des immobilisierten Antikörpers mit dem Cortisol untersucht. Bei einer Inkubationstemperatur von 0 °C wie auch bei 23 °C änderte sich die Dosis-Wirkungs-Kurve nicht wesentlich (Abb.4.). Ähnliche Beobachtungen machten auch Roller und Mitarb. (20). Zur Prüfung der Zuverlässigkeit der Ergebnisse dieser Gesamtcortisolbestimmung mit immobilisiertem Antikörper wurden sie mit Ergebnissen verglichen, die mit mobilem Antikörper nach vorhergehender Extraktion des Serums mit der Kohle-Trenn-Technik erzielt wurden. Wie in Abb.5. dargestellt, wurde eine strenge Korrelation ($r=0,97$) gefunden. Die Meßwerte für das Gesamtcortisol im Serum bei der Qualitätskontrolle von Tag zu Tag und bei der Qualitätskontrolle der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie (3. Hormon-Ringversuch vom Februar 1977) zeigen die Präzision und die Richtigkeit dieses Festphasen - Radioimmunoassays (S.27). Aus den Ergebnissen von 23 Dreifachbestimmungen der gleichen Probe an verschiedenen Tagen wurde 10,3 % als Variationskoeffizient errechnet.

Die Vorteile dieser Methode zur Bestimmung des Gesamtcortisols im Serum sind Einfachheit, schnelle Durchführung und hohe Spezifität für Cortisol (Tab.1.). Es werden nur 0,1 ml Serum für die Bestimmung eines Doppelwertes benötigt. In 40 Minuten liegen die Ergebnisse der Gesamtcortisolbestimmung vor. Die Zahl der Proben, die in diesem Zeitraum bestimmt werden können, hängt von der Anzahl der Ausgänge der Pumpe ab.

5.2 Diskussion der Bestimmung des diffusiblen Cortisols im Serum

Die Bestimmung des diffusiblen Cortisols ist deswegen problematisch, weil der Cortisol-CBG-Komplex dissoziiert, sobald diffusibles Cortisol abgetrennt wird. Die Halbwertszeit des Cortisol-CBG-Komplexes ist temperaturabhängig; sie beträgt bei einer Temperatur von 4°C 25 Minuten (7). Um die aktuelle, diffusible Cortisolfraktion zu erfassen, muß die Dissoziation des Cortisol-CBG-Komplexes vermieden oder gering gehalten werden. Dies wird durch rasche Trennung des diffusiblen Cortisols vom Cortisol-CBG-Komplex bei möglichst niedriger Temperatur zu erreichen versucht. In der vorliegenden Arbeit kommt eine hohe Trenngeschwindigkeit dadurch zustande, daß trockenes Antikörpergel vorgelegt wird und auf diese Weise das Außerkornvolumen extrem klein (0,6-0,7 ml) gehalten wird (Abb.7.). Dieses kann schnell eluiert werden. Es enthält unter anderem den Cortisol-CBG-Komplex. Außerdem wird die Dissoziationsgeschwindigkeit zusätzlich niedrig gehalten, weil die Temperatur der Serumprobe bei Aufgabe auf das Antikörpergel 0°C beträgt.

Die Porengröße des Gels (0,8-0,9 nm) verhindert sowohl das Eindringen des Cortisol-CBG-Komplexes (Moleküldurchmesser des CBG: 7,2 nm) in das innere Gelkornvolumen, als auch das Aus-treten des Antikörpers (Durchmesser des IgG-Globulins: 4,4 nm) in das äußere Gelkornvolumen.

Die Elution des Cortisol-CBG-Komplexes wird mit dem Indikator-

hapten ^3H -Cortisol durchgeführt. Dieses besetzt die vom diffusiblen Serumcortisol freigelassenen Bindungsstellen des immobilisierten Antikörpers. Durch Anwendung dieser Modifikation der Folge-Inkubation (33), wird mit geeignet hohen Indikatorhapten-Konzentrationen die Steilheit der Dosis-Wirkungs-Kurve des diffusiblen Cortisols erhöht (Abb.6.).

Der prozentuale Anteil des diffusiblen Cortisols am Gesamt-cortisol steigt erwartungsgemäß mit zunehmender Serumverdünnung (Abb.8.). Die Ergebnisse von Baumann und Mitarb. (1), die diese Auswirkung der Serumverdünnung mit der Dialyse untersuchten, stimmen mit den Ergebnissen unserer Methode gut überein.

Umgerechnet auf Konzentrationsverhältnisse im unverdünnten Serum entsprechen die Werte der diffusiblen Cortisolbestimmung mit immobilisiertem Antikörper (Tab.3.) denen von Baumann und Mitarb. (1) und von Kley und Mitarb. (16), die ihre Bestimmungen mit der Gleichgewichtsdialyse vornahmen. Der von uns ermittelte Normalbereich der Serumkonzentration des diffusiblen Cortisols im dritten Trimenon der Schwangerschaft wird auch von Simmer und Mitarb. (22) angegeben. Diese Arbeitsgruppe führte die Bestimmungen mit der Gleichgewichtsdialyse und der Ultrafiltration durch.

Zur Prüfung der Richtigkeit dieser radioimmunologischen Bestimmung des diffusiblen Cortisols wurde cortisolfreies Humanserum mit ^3H -Cortisol gesättigt, und die mit immobilisiertem Antikörper durchgeführte Bestimmung der ans CBG gebundenen und freien Anteile des Hormons mit zwei anderen Bestimmungs-

methoden verglichen. Als Referenzmethoden wurden die Kohle-Trenn-Technik und die Gleichgewichtsdialyse gewählt. In der Scatchard-Antragung zeigten sich annähernd gleiche Kurvenverläufe (Abb.9.). Bei einer Temperatur von 0 °C betrug die Assoziationskonstante der Cortisol-CBG-Interaktion $K_{\text{ass}} = 2,5 \times 10^8$ l/mol (Tab.2.). Westphal (30) und Chan und Mitarb. (3) gaben Assoziationskonstanten von $5,2 \times 10^8$ l/mol und $2,1 \times 10^8$ l/mol an.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Methode erlaubt eine direkte Bestimmung des diffusiblen Cortisols im Serum. Sie ist einfach, schnell durchzuführen und für Cortisol spezifisch (Tab.1.). Aus den Ergebnissen von 18 Dreifachbestimmungen der gleichen Probe an verschiedenen Tagen wurde 14,7 % als Variationskoeffizient errechnet (S.31.). Für eine Doppelbestimmung werden nur 0,1 ml Serum benötigt. Die Durchführung der Bestimmung dauert 20 Minuten. Die Zahl der Serumproben, die in diesem Zeitraum bestimmt werden können, hängt von der Anzahl der Ausgänge der beiden Pumpen ab.

6 ZUSAMMENFASSUNG

6.1 Bestimmung des Gesamtcortisols im Serum mit immobilisiertem Antikörper

Es wird eine einfache, radioimmunologische Methode zur Bestimmung der Gesamtcortisol-Konzentration des Serums beschrieben. Durch Ansäuern wird die Bindung des Cortisols an das CBG zerstört. Der Probe wird beim Ansäuern ^3H -Cortisol zugesetzt. Diese wird anschließend auf trockenes Gel aufgegeben, in das der Anti-Cortisol-C 3-Konjugat-Antikörper eingeschlossen ist. Durch Elution wird freies vom antikörpergebundenem Steroid getrennt, die Radioaktivität des Eluates gemessen und die Gesamtcortisol-Konzentration der Probe auf der Eichkurve abgelesen.

Die Methode erwies sich als hinreichend spezifisch, richtig und präzise zur Bestimmung des Gesamtcortisols im Serum. Ihre Spezifität wurde dadurch erreicht, daß gegen Cortisol-C 3-Konjugat gerichtetes Antiserum verwendet wurde, das Substituenten an C-17 erkennen kann. Die Durchführung der Bestimmung ist einfach; sie dauert 40 Minuten. Die Anzahl der Proben, die in dieser Zeit bestimmt werden können, hängt von der Zahl der Ausgänge der Pumpe ab. Die Richtigkeit ist durch strenge Korrelation ($r=0,97$) der Ergebnisse von Serumanalysen mit immobilisierten und mobilen Antikörpern charakterisiert. Der von Tag zu Tag ermittelte Variationskoeffizient beträgt 10,3 %.

6.2 Bestimmung des diffusiblen Cortisols im Serum mit immobilisiertem Antikörper

Ein Festphasen-Radioimmunoassay zur Bestimmung des im Serum nicht an das Transportprotein (CBG) gebundenen, diffusiblen Cortisols wird beschrieben. Durch Anwendung in trockenem Gel immobilisierter Antikörper — in Verbindung mit der Folge-Inkubation — wird es möglich, nach Aufgeben von Serumprobe auf das Antikörpergel, eine Trennung des diffusiblen Cortisols vom CBG-Cortisol-Komplex zu erreichen. Nur das diffusible Cortisol strömt in die Poren des Antikörpergels und wird vom Antikörper gebunden. Durch anschließende Elution des CBG-Cortisol-Komplexes aus dem Gel und Inkubation des Antikörpergels mit einer definierten Menge Indikatorhaptten, konkurriert nur das diffusible Cortisol der Probe mit dem Indikatorhaptten um den Antikörper. Freies wird vom antikörpergebundenen Steroid durch Elution getrennt, die Radioaktivität des Eluates gemessen und die Konzentration des diffusiblen Cortisols der Probe auf der Eichkurve abgelesen.

Die Methode erwies sich als hinreichend präzise, richtig und spezifisch zur Bestimmung des diffusiblen Cortisols im Serum. In 40 Minuten können die Ergebnisse der Hormonbestimmung vorliegen. Die Zahl der Proben die in diesem Zeitraum bestimmt werden können, hängt von der Anzahl der Ausgänge der beiden Pumpen ab. Bei der Qualitätskontrolle von Tag zu Tag betrug der Variationskoeffizient 14,7 %. Die Richtigkeit der Bestimmung mit immobilisiertem Antikörper ist durch den Vergleich

der Ergebnisse von Sättigungsanalysen cortisolfreien Human-serums mit zwei Referenzmethoden charakterisiert. Die Spezifität dieser Methode wurde dadurch erreicht, daß gegen Cortisol-C 3-Konjugat gerichtetes Antiserum verwendet wurde, das Substituenten an C-17 unterscheiden kann.

7 LITERATUR

1. BAUMANN,G.,RAPPAPORT,G.,LEMARCHAND-BERAUD,T. and J.P. FELBER: Free cortisol index: A rapid and simple estimation of free cortisol in human plasma.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 40, 462-469, (1975).
2. CAMPBELL,A.L. and B.E.P. MURPHY: The maternal-fetal gradient during pregnancy and at delivery.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 45, 435-440, (1977).
3. CHAN,D.W. and W.R. SLAUNWHITE,Jr.: The chemistry of human transcortin. The effects of pH, urea, salt and temperature on the binding of cortisol and progesterone.
Arch. Biochem. Biophys. 182, 437-442, (1977).
4. DASH,R.J.,ENGLAND,B.G.,MIDGLEY,A.R.,Jr. and G.D. NISWENDER: A specific non-chromatographic radioimmunoassay for human plasma cortisol.
Steroids 26, 647-661, (1975).
5. DAUGHADAY,W.H.: Binding of corticosteroids by plasma proteins. III. The binding of corticosteroid and related hormones by human plasma and plasma protein fractions as measured by equilibrium dialysis.
J. Clin. Invest. 37, 511-518, (1958).

6. DE MOOR,P.,HEIRWEGH,K.,HEREMANS,J. and M. DECLERCK-RASKIN:
Proteinbinding of corticoids studied by gel filtration.
J. Clin. Invest. 41, 816-827, (1962).
7. DIXON,P.F.: The kinetic of the exchange between transcortin-bound and unbound cortisol in plasma.
J. Endocr. 40, 457-465, (1968).
8. DOE,R.P.,ZINNEMANN,H.H.,FLINK,E.B. and R.A. ULSTROM: Significance of the concentration of nonprotein-bound plasma cortisol in normal subjects,Cushing's syndrome, pregnancy and during estrogen therapy.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 20, 1484-1492, (1960).
9. DOE,R.P.,FERNANDEZ,R.N. and U.S. SEAL: Measurement of corticosteroid binding globulin in man.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 24, 1029-1039, (1964).
10. DOE,R.P.,DICKINSON,P.,ZINNEMANN,H.H. and U.S. SEAL: Elevated non protein-bound cortisol in pregnancy, during estrogen administration and in carcinoma of the prostate.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 29, 757-766,(1969).

11. DONOHUE, J. and D. SGOUTAS: Improved radioimmunoassay of plasma cortisol.
Clin. Chem. 21, 770-773, (1975).
12. ERLANGER, B.F., BOREK, F., BEISER, S.M. and S. LIEBERMANN:
Steroid-protein conjugates; II. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with progesterone, deoxycorticosterone and estrone.
J. Biol. Chem. 234, 1090-1094, (1959).
13. FAHMY, D., READ, G.F. and S.G. HILLIER: Some observations on the determination of cortisol in human plasma by radioimmunoassay using antisera against cortisol-3-BSA.
Steroids 26, 267-280, (1975).
14. GOODFRIEND, T., BALL, D. and S. UPDIKE: Antibody in polyacrylamide gel, a solid phase reagent for radioimmunoassay.
Immunochemistry 6, 481-484, (1969).
15. KAO, M., VOINA, S., NICHOLS, A. and R. HORTON: Parallel radioimmunoassay for plasma cortisol and 11-deoxycortisol.
Clin. Chem. 21, 1644-1647, (1975).

16. KLEY, H.K., BARTMANN, E. and H.L. KRÜSKEMPER: A simple and rapid method to measure non-protein-bound fractions of cortisol, testosterone and oestradiol by equilibrium dialysis: Comparison with centrifugal filtration.
Acta Endocrinol. 85, 209-219, (1977).
17. LORIAUX, D.L., GUY, R. and M.B. LIPSETT: A simple, quick solid-phase method for radioimmunoassay of plasma estradiol in late pregnancy and of cortisol.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 36, 788-790, (1973).
18. MAURER, H.R.: in: Diskelektrophorese. Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamidgel-Elektrophorese.
Walter de Gruyter & Co, Berlin, 1-50, (1968).
19. ROBIN, P., PREDINE, J. and E. MILGROM: Assay of unbound cortisol in plasma.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 46, 277-283, (1977).
20. ROLLERI, E., ZANNINO, M., ORLANDINI, S. and R. MALVANO: Direct radioimmunoassay of plasma cortisol.
Clin. Chim. Acta 66, 319-330, (1976).
1. RUDER, H.J., GUY, R.L. and M.B. LIPSETT: A radioimmunoassay for cortisol in plasma and urine.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 35, 219-224, (1972).

22. SIMMER, H.H., FRANKLAND, M.V. and M. GREIPEL: Unbound unconjugated cortisol in umbilical cord and corresponding maternal plasma.
Gynecol. Invest. 5, 199-221, (1974).
23. SLAUNWHITE, W.R., Jr., LOCKIE, G.N., BACK, N. and A.A. SANDBERG: Inactivity in vivo of transcortin-bound cortisol.
Science 135, 1062-1063, (1962).
24. TAIT, J.F. and S. BURSTEIN: In vivo studies of steroid dynamics in man. In: The Hormones, vol.V, chapter IV. Eds.: G. Pincus, K.V. Thimann and E.B. Astwood.
New York-London, Academic Press, 441-557, (1964).
25. TILDEN, R.L.: New, advantageous approach to the direct radioimmunoassay of cortisol.
Clin. Chem. 23, 211-215, (1977).
26. UPDIKE, S.J., SIMMONS, J.D., GRANT, D.H., MAGNUSON, J.A. and T.L. GOODFRIEND: Gel entrapment of antibody: A new strategy for facilitating both manual and automated radioimmunoassay.
Clin. Chem. 19, 1339-1344, (1973).

27. UPTON, G.V. and P.K. BONDY: The binding of cortisol by plasma protein.
Arch. Biochem. 78, 197-205, (1958).
28. WESTPHAL, U.: Assay and properties of corticosteroid-binding globulin and other steroid-binding serum proteins.
Meth. Enzymol. 15, 785-786, (1969).
29. WESTPHAL, U.: Corticosteroid-binding globulin and other steroid hormone carriers in the blood stream.
J. Reprod. Fert., Suppl. 10, 15-38, (1970).
30. WESTPHAL, U.: Characteristics of steroid-protein interactions, including results on a progesterone-binding globulin.
Excerpta Medica International Congress Series No. 219, 410-419, (1970).
31. WESTPHAL, U.: Steroid-protein interactions.
Springer Verlag, New York-Heidelberg, 434-445, (1971).
32. WESTPHAL, U.: Zur Bindung von Steroidhormonen an Serumproteine.
Klin. Wschr. 55, 877-880, (1977).

33. ZETTNER, A. and P.E. DULY: Principles of competitive binding assays (saturation analyses). II. Sequential saturation.
Clin. Chem. 20, 5-14, (1974).

Herrn Professor Dr. Dr. E. Kuß sei an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und seine freundliche Mithilfe herzlichst gedankt.

Herrn Professor Dr. J. Zander danke ich für die Übernahme des Coreferates.

Frau H. Enderle, Frau H. Jennen und Frau R. Joswig danke ich für die freundliche Anleitung bei der Durchführung der Laborarbeiten.

Lebenslauf

Am 22. Oktober 1950 wurde ich, Fritz Zehmisch, als Sohn des Juristen Fritz Zehmisch und seiner Ehefrau Regine, geborene Herrenberger, in Ulm/Do geboren. In München besuchte ich die Volksschule und anschließend das Oskar-von-Miller-Gymnasium. Im Juni 1970 legte ich dort die Reifeprüfung ab. Von Herbst 1970 bis Frühjahr 1972 leistete ich meinen Zivildienst im Nervenkrankenhaus Haar bei München ab. Anschließend studierte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München ein Semester Physik, zwei Semester Tiermedizin, ab Herbst 1973 Humanmedizin. Ich legte die Ärztliche Vorprüfung 1974, den ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 1975, den zweiten Abschnitt 1977 und den dritten Abschnitt am 30. Oktober 1978 ab. Seit 1976 bin ich mit meiner Frau Brigitte, geb. Mandel, verheiratet.

